AUS DER UNIVERSITÄTS-KINDERKLINIK ZU BRESLAU
DIREKTOR: PROF. DR. STOLTE

EINE EXAKTE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER BLUTGERINNUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

IN DER

MEDIZIN UND CHIRURGIE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

SCHLESISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT
ZU BRESLAU

VORGELEGT VON

GÜNTHER ELIAS
MEDIZINALPRAKTIKANT AN DER UNIVERSITÄTSKINDERKLINIK

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1931

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der
Hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

Berichterstatter:
I. Privatdozent Dr. Klinke
II. Professor Dr. Stolte

Sonderdruck aus: „Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin“
Bd. 77, Heft 5/6.

Seitdem man sich mit dem Problem der Blutgerinnung beschäftigt, sind die verschiedensten Untersuchungsmethoden angegeben worden mit dem Ziel, diesen für den Organismus so bedeutsamen Vorgang möglichst genau zu erfassen. Die älteste dieser Methoden stammt von *Vierordt* [2]. Von *Schulz, Löwenthal, Heubner, Fonio* [2] und anderen sind weitere Methoden angegeben worden. In die Klinik hat sich zumeist die *Bürker*sche Methode eingeführt. Sie besteht darin, daß in dem mit Blut beschickten Hohlschliff eines Objektträgers das Auftreten der ersten Fibrinfäden beobachtet wird.

Eine wertvolle Hilfe bei der Durchsicht der das Problem der Blutgerinnung behandelnden Literatur ist in der Monographie von *Wöhlisch* [12]: *Die Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung,* die eine kritische Bewertung der bisherigen Untersuchungen enthält, gegeben. In dieser Arbeit ist bereits darauf aufmerksam gemacht, daß den beschriebenen Methoden der Gerinnungsbestimmung eine erhebliche Bedeutung für exakte Messungen nicht zukommt. *Wöhlisch* selbst hat deshalb schon einen neuen Weg beschritten [13]. Er bestimmte den Gerinnungsbeginn an durch Hämolyse mit destilliertem Wasser lackfarben gemachtem Blut durch das Auftreten der ersten Trübung. Das Gerinnungsende wird getrennt davon in Brillengläsern von bekannter Krümmung erfaßt. Gemeinsam ist allen diesen Methoden, daß der Gerinnungsbeginn zwar einigermaßen sicher, das Gerinnungsende aber nur sehr unsicher, wenn überhaupt, festgelegt werden kann. Für klinische Zwecke werden sie als ausreichend empfunden.

Zwei Methoden ragen aus den bisher angegebenen hervor. Zunächst die Bestimmung mit dem Koaguloviscosimeter von *Kottmann* [6]. Dieser Autor bringt Blut in ein um seine Achse rotierendes Gefäß. Es werden nun bei Betrieb des Apparates zuerst die der Gefäßwand nächsten Schichten viscös. Allmählich schreitet der Prozeß nach dem Zentrum fort. In der Mitte des Gefäßes ist ein Schäufelchen angebracht, das von dem geronnenen Blut mitbewegt werden wird. Die Ablenkung des Schäufelchens dient zur Bestimmung der Gerinnung. Mit Recht hat *Morawitz* gegen diese Methode den Einwand erhoben, daß die Oberfläche des Schäufelchens durch Auflagerung von Fibrinflocken hierbei einem dauernden Wechsel unterworfen ist. Die Größe der Oberfläche spielt jedoch bei der Viscositätsbestimmung eine ganz wesentliche Rolle. *Sahli* hat vor allem gegen die Methode eingewandt, daß das Schäufelchen bei dieser Untersuchungsweise eine Defibrinierung bedinge, die den Gerinnungsprozeß erheblich beeinträchtigen muß. Im allgemeinen hat sich diese Methode nicht einzuführen vermocht.

Am nächsten dem Ziele, den Gerinnungsvorgang exakt aufzuzeichnen, kommt wohl *Kugelmaß* [7]. Seine Methode basiert auf der Bestimmung der Transparenzänderung des Blutes während des Ablaufes der Gerinnung. Hinter dem zu untersuchenden Plasma wird eine Lichtquelle von konstanter Stärke aufgestellt. Die von dem Plasma durchgelassene Strahlenmenge ist begreiflicherweise vor dem Eintritt der Gerinnung am größten, nimmt dann proportional der sich steigernden Verdichtung ab, um nach völlig abgeschlossener Gerinnung am niedrigsten zu sein. Die jeweils durchgelassene Strahlenmenge läßt man auf ein Thermoelement wirken und mißt den entstehenden Strom am Galvanometer. Es gelingt mit dieser Methode, den Gerinnungsablauf graphisch zu registrieren. Doch hat auch diese Art der Ausführung, trotzdem sie dem gewünschten Ziel von allen bisher angegebenen Untersuchungsmethoden am nächsten kommt, den Nachteil mangelnder Genauigkeit. Die an dem Galvanometer abzulesenden Ausschläge sind nämlich nicht proportional der durchgelassenen Strahlenmenge, so daß eine exakte Registrierung auch hier Schwierigkeiten begegnet. Dieser Umstand erklärt wohl auch den merkwürdig gebrochenen Kurvenverlauf, der für das organische Geschehen zum mindesten ungewöhnlich wäre *.

Die einzig faßbare Veränderung bei der Gerinnung ist die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. *Kugelmaß* [7] sagt darüber: La coagulation du sang consiste essentiellement en la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Diesen Vorgang zu erfassen war unser

* Die Gewinnung von Transparenzkurven ist ferner deswegen wenig geeignet, weil die Lichtabsorption in Potenzen der Konzentration wächst. Infolgedessen werden sich wegen der Größenunterschiede photometrisch kaum faßbare Resultate erzielen lassen.

Ziel, da man voraussetzen konnte, daß ein solcher Vorgang mit kolloidchemischen Strukturveränderungen einhergehen muß.

Ganz grob beschrieben, findet der Übergang eines Sols (Fibrinogen) in ein Gel (Fibrin) statt. Daß es sich hierbei wohl um einen Micellarkrystallisationsprozeß (*Hekma:* Zitiert nach *Wöhlisch* [12]) handelt, ist für diese Problemstellung relativ bedeutungslos. Derartige Übergänge von Sol zu Gel sind am ehesten tyndallometrisch zu erfassen. Wenn man dasselbe Plasma in flüssigem und geronnenem Zustande vergleicht, so erkennt man den deutlichen Unterschied in der Trübung. Die Aufgabe war, diese Veränderungen messend zu erfassen. Das *Prinzip der neuen Methode* bestand also darin, *den von dem gebildeten Fibrin erzeugten Tyndalleffekt zu messen.*

Als beste Möglichkeit bot sich die photometrische Messung mit Hilfe des Stufenphotometers. Diese ist gerade mit Bezug auf Trübungsreaktionen von *Zangemeister* und *Krieger* [15], *Gärtner* [3], sowie *Klinke* [5] angewandt worden.

Das Prinzip des *Pulfrich*schen Stufenphotometers besteht darin, daß die Messung der Lichtintensität durch eine veränderliche, stets quadratische Blende vorgenommen wird. Die Veränderung der quadratischen Blende wird auf eine kreisrunde Trommel von 360° übertragen. Diese Verknüpfung von quadratischem Ausschnitt und Winkelablesung führt zu einer Gradeinteilung, die etwa den Empfindungsstufen des Auges angepaßt ist, so daß bei kleinen Helligkeiten größere Genauigkeit — entsprechend dem *Weber-Fechner*schen Gesetz — erreicht wird. Diese Methode gestattet auch bei größeren Helligkeitsdifferenzen exakte Messungen. Auf die eingehende Beschreibung der Apparatur kann hier verzichtet werden, da diese bereits von *Zangemeister* und *Krieger* [15], sowie *Heilmeyer* [4] gegeben ist.

Bei den Gerinnungsstudien wurde das Becherglasverfahren mit konstantem trübem Vergleichskörper angewandt. Die zu untersuchenden Flüssigkeiten wurden in Reagensgläsern aus Jenenser Glas von 18 mm Weite beobachtet. Sämtliche Ablesungen erfolgten unter Vorschaltung des Grünfilters.

Mit der Benutzung dieser Methode wird in der Tat das von einer Einheit ausgestreute Tyndallicht gemessen, so daß sich Fehlerquellen durch Vergrößerung oder Verkleinerung der streuenden Schicht, wie bei *Kleinmanns* Nephelometer, nicht einschleichen können. Hierauf beruht der Wert dieses neuen Verfahrens.

Die Berechnung der Versuche erfolgte in der Weise, daß der trübe Körper mit der Blendenöffnung 100 eingesetzt wurde. Darin wurde die Ablesung der Vergleichslösung dividiert und die Quotienten als Intensitätswerte eingesetzt *.

---

* Die Berechnungsweise gründet sich auf die Anwendung des *Rayleigh*schen Gesetzes (zit. nach *Freundlich* [1]). Danach sind die Lichtintensitäten proportional der Konzentration der dispergierten Teilchen und dem Quadrat der Amplitude des auffallenden Lichtes.

Das *Rayleigh*sche Gesetz lautet: $I = \frac{i_0}{i} = \frac{9\nu \cdot \pi^2 \cdot v^2 \cdot A^2}{\lambda^4 \cdot x^2} \cdot \left(\frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2n^2}\right) \cdot \sin^2 \alpha.$

Hierbei sind:

ν = die Zahl der in der Volumeneinheit enthaltenen Teilchen.
v = Volumen der Teilchen.
A = Amplitude des auffallenden Lichtes.
λ = Wellenlänge
x = Abstand vom betrachteten Teilchen.

Die Fehlerquellen dieser Apparatur sind nur gering, ihre Reaktionsbereitschaft ist außerordentlich fein. Wir sind imstande, mit Hilfe des Nephelometers kolloidale Verschiebungen bereits ganz deutlich wahrzunehmen, wo makroskopisch nicht die geringste Veränderung zu finden ist.

Bei der für unsere Untersuchungen der Blutgerinnung vorgenommenen Anwendung des Nephelometers stellte sich jedoch ein Nachteil heraus. Es ist nicht möglich, mit der später eingehend beschriebenen Methode die Gerinnung des Gesamtblutes zu verfolgen. In einer großen Anzahl von Versuchen haben wir uns bemüht, durch verschiedenartigste Modifikationen dieser Schwierigkeit Herr zu werden. Das war jedoch bisher unmöglich. Es ist sogar auf Grund unserer Erfahrungen wahrscheinlich, daß man mit einem Gelingen dieser Versuchsanordnung in absehbarer Zeit nicht wird rechnen dürfen. Der Grund für die — mindestens bis auf weiteres vorhandene — Unmöglichkeit der Gerinnungsbestimmung am Gesamtblut liegt bei den Erythrocyten und Leukocyten. Durch ihre im Verhältnis zum Fibrinmolekül geradezu ungeheuere Größe verursachen sie eine so beträchtliche Überstrahlung, daß die lichtbrechenden Eigenschaften des Fibrinogen-Fibrinmoleküls ihnen gegenüber vollständig in den Hintergrund treten und nicht mehr wahrgenommen werden können. Die von seiten der großen Zellen dem Problem entgegenstehenden Momente konnten weder durch Hämolyse, noch durch Verdünnung, noch durch Schaffung möglichst geringer Dichte des Mediums vermittels räumlicher Einengung beseitigt werden. Infolgedessen war es notwendig, alle Untersuchungen an Blutplasma vorzunehmen. Das geschah in folgender Weise:

Frisches, beim Schlachten von Tieren möglichst steril aufgefangenes Blut wurde mit dem zehnten Teil seines Volumens einer 2,5%igen Natriumcitratlösung versetzt. Dieses Citratblut wurde dann etwa 20 Min. lang zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Plasma diente als Ausgangsmaterial für die Untersuchung. 6,0 ccm des Plasmas wurden in ein 18 mm weites Reagensglas gebracht und das Reagensglas in den mit destilliertem Wasser gefüllten Tyndallometerzusatz gestellt, der eine Temperaturkonstanz von durchschnittlich 22—23° aufwies. Um die Gerinnung einzuleiten, wurden nunmehr zu 6,0 ccm Plasma 0,05 ccm einer 4,25%igen Calciumchloridlösung hinzugesetzt, so daß eine Erhöhung des Calciumgehaltes um 12—13 mg-% eintrat. Die an dem gerinnenden recalcifizierten Plasma eintretenden Veränderungen des Tyndalleffektes wurden in Intervallen von 15—30 Sek. abgelesen. Auf diese Weise war es möglich, den Gerinnungsablauf zeitlich zu erfassen und graphisch darzustellen. Ein solcher Versuch sei zur Veranschaulichung beschrieben (Tabelle 1).

---

n = Brechungskoeffizient von Dispersionsmittel.
n_1 = Brechungskoeffizient von disperser Phase.
α = Betrachtungswinkel.
i_0 = Intensität des erregenden Lichtes.
i = Intensität des ausgsetrahlten Lichtes.

Auf unsere Untersuchungsmethode angewandt ergibt sich, daß ν in dieser Formel die einzige Variable ist, wenn man annimmt, daß keine Lichtabsorption stattfindet. Also $I = \text{konst.} \cdot \nu$.

Tabelle 1.

t = Ablesungszeit nach $CaCl_2$-Zusatz in Sek.	Tr = Trommelwert	J = Quotient der in 100 dividierten Trommelwerte	t = Ablesungszeit nach $CaCl_2$-Zusatz in Sek.	Tr = Trommelwert	J = Quotient der in 100 dividierten Trommelwerte
15	6,2	16,15	195	6,7	14,9
30	6,2	16,15	210	8,0	12,5
60	6,2	16,15	225	8,4	11,9
90	6,0	16,65	240	8,8	11,4
105	4,9	20,4	270	9,4	10,6
120	3,8	26,3	300	9,8	10,2
135	3,0	33,3	360	9,8	10,2
150	3,3	30,15	420	9,8	10,2
165	4,6	21,70	540	9,8	10,2
180	5,3	18,8			

Schweinecitratblut: Plasma etwa 20 Min. abzentrifugiert, 6 Std. nach Entnahme untersucht. Von dem Plasma sind 6,0 ccm in ein 18 mm weites Reagensglas übergeführt. Nach Temperatursteigerung auf 22° wurden 0,05 ccm einer 4,25%igen Calciumchloridlösung zugesetzt.

Vergleichsstandard des trüben Körpers = 100.

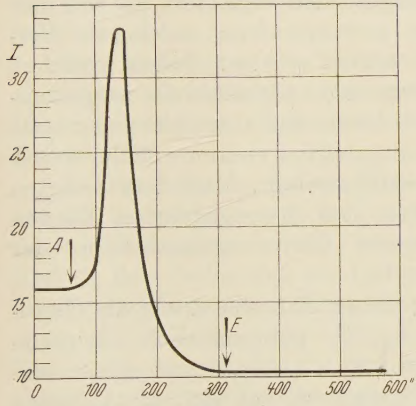

Abb. 1. Tyndallometrische Gerinnungskurve von Schweineplasma (Versuch 5). A Beginn der Gerinnung; E Ende der Gerinnung.

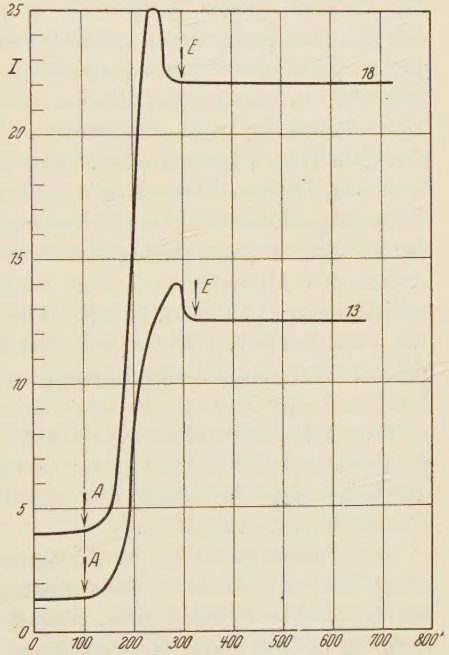

Abb. 2. Tyndallometrische Gerinnungskurven von Menschenplasma (Versuch 18) und Hammelplasma (Versuch 13).

Kurvenmäßig dargestellt ergibt sich folgendes Bild (Abb. 1).

Bevor die Kurve besprochen wird, sollen noch Gerinnungskurven anderer Tierarten wiedergegeben werden. In Abb. 2 ist eine Darstellung des Gerinnungsablaufes von Hammel- und Menschenplasma gegeben.

Aus den angeführten Kurven geht hervor, daß jede Tierart auch ihre Eigenheiten bezüglich des Gerinnungsgeschehens aufweist. Vielleicht liegt hier auch ein Grund für viele in völligem Gegensatz zueinander stehende Untersuchungsbefunde, die in der Literatur zu finden sind. Auffällig ist die große Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs bei Mensch und Hammel. Auf diese Tatsache hat *Fonio* [2] bereits einmal hingewiesen. Nach diesem Autor bezieht sich die Ähnlichkeit gleichermaßen auf das Plasma wie auf das Serum der beiden Blutarten.

Es sollen zunächst die Einwände diskutiert werden, die sich gegen die beschriebene Methode erheben lassen:

Es entsteht die Frage: Stellen die registrierten Kurven überhaupt den Gerinnungsablauf dar? Oder sind die auf diese Weise wahrgenommenen Veränderungen lediglich (woran man ja denken mußte) eine Folge des Calciumzusatzes? Diese für die ganze Methode bedeutungsvollste Frage bedurfte zu allererst der Klärung. Der Nachweis, daß der Zusatz von Calcium in der Tat für die Änderung des Tyndalleffektes belanglos ist, kann eindeutig durch den Kurvenverlauf an dem Plasma eines Hämophilen geführt werden. Versuch 14 a in Abb. 5 zeigt den Gerinnungsablauf eines hämophilen Blutes. Bei Versuch 14 ist innerhalb 2 Stunden eine Gerinnung nicht eingetreten. Hier war auch keine Änderung des Tyndalleffektes festzustellen. Aus der dargestellten Kurve, sowie aus dem angeführten Versuch 14 erhellt, daß der Calciumzusatz als solcher keine nephelometrischen Effekte bedingt. Wäre das der Fall, so müßte ja die Kurve ganz analog den vorhergehenden verlaufen, da sich nur durch das Hinzutreten neuer Ionen hervorgerufene molekulare Verschiebungen annähernd gleich schnell äußern würden. Zudem sprechen die nach den in der Klinik üblichen Methoden vergleichsweise vorgenommenen Gerinnungsbestimmungen auch dafür, daß tatsächlich das erste Umbiegen der Kurve mit dem Gerinnungsbeginn zusammenfällt, soweit sich das mit diesen Methoden exakt bestimmen läßt. Nach dem Gesagten dürfte nun kein Zweifel mehr bestehen, daß die registrierten Kurven durchaus den Ausdruck des wichtigsten Gerinnungsgeschehens, der Fibrinbildung, darstellen.

Man mußte nunmehr in Erwägung ziehen, daß eine durch die Gerinnung hervorgerufene Volumenänderung die photometrisch nachweisbaren Effekte bedinge bzw. abändere. Nun haben schon *Atzler* und *Döhring* (Zitiert nach *Wöhlisch* [12]) nachgewiesen, daß sich das Volumen bei der Gerinnung nicht ändert. Dieser Frage wurde noch einmal nachgegangen und versucht, Volumenänderungen während der Gerinnung festzuhalten. Zu diesem Zwecke wurde Citratblut in ein luftdicht abgeschlossenes Gefäß gebracht, das mit einer quecksilbergefüllten Glasröhre in Verbindung stand. Durch eine eingeschliffene Kippvorrichtung konnte man zu dem Blut Calciumchlorid hinzufügen, ohne das ganze System zu öffnen und das Volumen zu ändern. Volumenänderungen

hätten sich nun bei dieser Methode an Ausschlägen des Quecksilberfadens bemerkbar machen müssen. Das war nicht der Fall. Das Volumen während der Blutgerinnung bleibt konstant. Somit kommt auch dieser Faktor für die nephelometrischen Erscheinungen in Wegfall.

Von den übrigen Einwänden gegen die Ausführung der beschriebenen Gerinnungsbestimmung ist der bedeutungsvollste folgender: Die Methode kann nur für Studien am Plasma angewendet werden. Versucht man den Gerinnungsvorgang am Gesamtblut mit dieser Methode zu erfassen, so versagt sie, wie weiter oben bereits erwähnt wurde. Es ergibt sich zunächst die Frage: Gibt es Unterschiede in dem Gerinnungsablauf zwischen Gesamtblut und Plasma? Welcher Art sind diese? Sind sie für das Wesen der Gerinnung von Belang?

Bevor in diese Erörterung eingetreten werden soll, muß zunächst untersucht werden, welche Momente überhaupt für etwaige Verlaufsunterschiede verantwortlich gemacht werden können. Das durch Zentrifugieren gewonnene Plasma unterscheidet sich von dem Gesamtblut hauptsächlich durch das Fehlen der festen Bestandteile des Blutes, der Erythroctyen, Leukocyten und mindestens eines Teiles der Thrombocyten. Es muß deshalb zunächst die Bedeutung der zelligen Elemente, die in dem abzentrifugierten Plasma fehlen, für den Gerinnungsablauf geklärt werden. Dazu ist prinzipiell zu sagen, daß die nach den bekannten klinischen Methoden am Gesamtblut vergleichsweise vorgenommenen Gerinnungsbestimmungen niemals wesentliche Differenzen gegenüber den von uns am Nephelometer gefundenen Gerinnungszeiten des Plasmas aufwiesen.

Eine Bedeutung der Erythrocyten für das Zustandekommen der Gerinnung ist bis heute nicht anerkannt und unseres Wissens auch nie behauptet worden. Anders verhält es sich mit den Leukocyten und den Plättchen.

Was die Rolle der weißen Blutkörperchen für den Gerinnungsvorgang betrifft, so darf man nach den Untersuchungen von *Morawitz* an plättchenfreiem Gänseplasma, so wie *Vinci* und *Chistoni* (sämtlich zitiert nach *Wöhlisch* [12]) ihre Bedeutung als Lieferanten thromboplastischer Substanzen als erwiesen betrachten. Ebenso konnten *Frank* (zitiert nach *Wöhlisch* [12]), sowie *Wöhlisch* [12] an fast völlig thrombocytenfreiem Blut bei extremer Thrombopenie, wo die Autoren in einigen Fällen normale Gerinnungszeiten fanden, mit großer Wahrscheinlichkeit die Rolle der Leukocyten für die Abgabe von Thrombokinase erweislich machen. Trotzdem erscheint es berechtigt, die gerinnungsfördernde Rolle der weißen Blutkörperchen nach allem, was über die Gerinnung bekannt ist, nicht sehr hoch einzuschätzen. Wie schon *Morawitz* in den angeführten Untersuchungen gezeigt hat, geht die Abgabe von Thrombokinase durch die Leukocyten nur sehr langsam vorsich. Es ist daher anzunehmen, daß der Umstand des Fehlens der Leukocyten in unserer

Versuchsanordnung wegen seiner anscheinend minimalen Bedeutung praktisch vernachlässigt werden kann.

Es bleiben demnach als wesentlichster Faktor von den zelligen Elementen die Thrombocyten in ihrer Bedeutung für etwaige Differenzen des Gerinnungsverlaufes zu diskutieren. Die thromboplastische Rolle der Plättchen wird heute von keinem Forscher mehr bestritten. Durch die Untersuchungen von *Deetjen, Lesourd* und *Pagniez, Bordet* und *Delange* (sämtlich zitiert nach *Wöhlisch* [12]) ist ihre Eigenschaft, durch Abgabe von Thrombokinase die Gerinnung einzuleiten, eindeutig erwiesen. Die Untersuchungen von *Lesourd* und *Pagniez,* wie von einigen anderen Autoren zeigen aber gleichzeitig, wie schwer es ist, durch Zentrifugieren ein Plasma plättchenfrei zu machen. Da uns nun das Zentrifugieren lediglich dazu diente, die für unsere Untersuchungen erforderliche Transparenz durch Entfernung der Leukocyten und Erythrocyten zu erzeugen, was schon nach etwa 20 Min. mäßig scharfen Zentrifugierens (Tourenzahl etwa 2000, Radius 16 cm) der Fall war, muß damit gerechnet werden, daß das auf diese Weise gewonnene Plasma noch hinreichend Thrombocyten enthielt. Das beweist schon die Tatsache, daß auf Calciumzusatz regelmäßig die Gerinnung eintrat, was bei völliger Abwesenheit von Thrombocyten und Leukocyten unerklärlich wäre. Andererseits werden aber besonders wegen des fermentativen Charakters der von den Thrombocyten gelieferten Thrombokinase Unterschiede in der Zahl der Thrombocyten nicht zu hoch bewertet werden dürfen. Diese Annahme wird gerade durch die vorhin erwähnten, von *Frank* und *Wöhlisch* gefundenen normalen Gerinnungszeiten bei extremster Thrombopenie bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich gemacht.

Auf Grund der hier angeführten Überlegungen ist anzunehmen, daß die in der beschriebenen Weise vorgenommene Untersuchung am Plasma ein praktisch wohl völlig naturgetreues, zum mindesten gut reproduzierbares Spiegelbild der Gerinnung am Gesamtblut darstellt. Und auf Vergleichsresultate beschränken sich schließlich alle bisher angegebenen Bestimmungsmethoden.

Von mehreren Seiten ist darauf hingewiesen worden, daß Blutgerinnungsbestimmungen nur dann den Anspruch auf Genauigkeit machen dürften, wenn ihre Untersuchung in einem paraffinierten System erfolge, d. h. daß das Blut bis zu dem Abschluß der Gerinnung nicht mit Glas in Berührung kommen dürfe. Nach einer Mitteilung von *Deetjen* und *Gratia* (zitiert nach *Wöhlisch* [12]) wird bei Berührung des Blutes mit Glas und der damit verbundenen Abgabe von Alkali durch das Blut der Zerfall der Plättchen beschleunigt und dadurch die Gerinnungszeit verkürzt. Eine Untersuchung in paraffinierten Gläsern ist bei der nephelometrischen Bestimmungsmethode infolge der schwierigen Brechungsberechnung des Paraffins sehr erschwert und wahrscheinlich ungenau. Es lag uns aber weniger daran, mit früheren Autoren übereinstimmende Zahlen für die physiologischen Gerinnungszeiten anzugeben, als vielmehr die Methode für vergleichende Untersuchungen auszuwerten und nachzuweisen, daß sich in der Tat die Gerinnungszeiten auf diese Weise eindeutig bestimmen lassen. Die Schaffung fast völlig physiologischer Ver-

suchsbedingungen für die angegebene Art der Ausführungen dürfte vielleicht nicht einmal auf zu große Schwierigkeiten stoßen (Quarzglas!).

Für unsere Zwecke war es zunächst wesentlicher, exakt reproduzierbare Resultate zu erzielen. Das ist erreicht worden. Versuche, die unter gleichen Bedingungen nacheinander ausgeführt wurden, ergaben absolut übereinstimmende Kurven.

Es erhebt sich nunmehr die Frage, wie die hier wiedergegebenen Kurven zu deuten sind. Man sieht bei allen Darstellungen, daß nach einem Stadium völliger Ruhe (Vorgerinnung nach *Kugelmaß* [4]?) ziemlich plötzlich ein Umbiegen erfolgt. Aus dem angeführten erhellt, daß dieser *Umbug* mit dem Beginn der Gerinnung identisch ist. Danach steigt die Kurve mehr oder weniger steil an, bis sie einen Höhepunkt erreicht, um sich darauf zu halten bzw. wieder abzusinken. Der Kurvenverlauf erweist, daß die Gerinnung, soweit wir sie in der Fibrinbildung fassen können, ein stetig progredienter Prozeß ist. Der erste Umbug stellt den Beginn der Fibrinbildung dar. Der Moment, wo die Kurve wieder mit der Zeitachse parallel zu werden beginnt, fällt mit dem Zeitpunkt der quantitativen Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin zusammen.

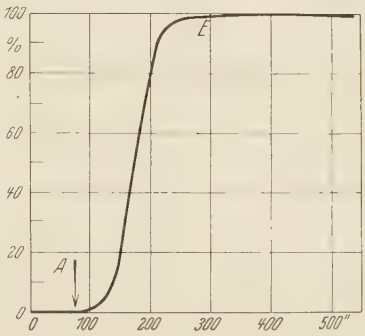

Abb. 3. Umrechnung der Abb. 2 (Versuch 5) auf echte Konzentrationen (Endwert der Fibrinflockung = 100) gemäß der Formel in Mitteilung IV.

Das Absteigen der Kurve beruht darauf, daß durch das Fibringel eine zunehmende Lichtschwächung bedingt wird, durch welche die Intensität des erregenden Lichtes immer stärker geschwächt wird, so daß der scheinbare Wert J kleiner wird. In Wirklichkeit wird, wie die Umzeichnung des Versuches 5 in Abb. 3 ergibt, der absolute Wert von J stetig steigen, bis er einen Höhepunkt erreicht, der als das Ende der Gerinnung anzusehen ist. (Vgl. die umgerechnete Kurve in Abb. 3.)

Für die gewöhnliche klinische Untersuchung wird man auf die komplizierte Umrechnung der Quotientenzahlen mit Hilfe der in der III. Mitteilung angegebenen Formel in absolute Werte verzichten können, da es nur darauf ankommt, Beginn und Ende der Fibrinflockung genau festzulegen. Der Beginn der Flockung fällt mit dem Ansteigen der Kurve zusammen. Der Endpunkt ist mit dem Moment gegeben, wo die Kurve der Zeitachse parallel zu werden beginnt.

Diese beiden Zeitpunkte lassen sich mit der angegebenen Methode — ohne die rechnerisch sehr schwierige Umrechnung — eindeutig bestimmen. Notwendig wird diese Berechnung dann, wenn man den Kurvenverlauf mathematischen Auswertungen zugrunde legen will (s. IV. Mitteilung).

Was in dem Zeitraum bis zur ersten Flockung geschieht — ob diese Latenzzeit durch langsame Thrombinbildung hervorgerufen wird — kann erst später entschieden werden. Als sicher darf hingestellt werden, daß mit dieser Methode ein Mittel gefunden ist, Beginn und Ende der Gerinnung absolut sicher festzulegen. Nicht sicher ist bisher erwiesen, inwieweit aus der Höhe der absoluten Kurve und der Steilheit des Verlaufs Schlüsse auf die Gerinnungsintensität gezogen werden können. Dieses Moment könnte unter Umständen für die erst in allerjüngster Zeit wieder von *Morawitz* und *Jürgens* [8] diskutierte Frage der Thrombasthenie von Bedeutung werden. Vielleicht ist es auch geeignet, uns dem von *Fonio* geschaffenen Begriff der Gerinnungsvalenz näher zu bringen. Obwohl wir nach einigen Erfahrungen zu der Annahme neigen, daß hier ein solcher Weg gegeben ist, soll doch nicht — ohne nähere Untersuchungen an einem größeren Material — ein diesbezügliches Urteil abgegeben werden.

Auffällig ist der von uns fast durchgehend gefundene frühe Gerinnungsbeginn. Er liegt, wie aus den dargestellten Kurven ersichtlich ist, zwischen 1 und 2 Min., was im Gegensatz zu den meisten Angaben der Literatur steht.

Der beschleunigte Gerinnungseintritt dürfte vor allem durch 4 Momente verursacht sein. Einmal fanden die Bestimmungen in einem Glasgefäß statt. Es wird also die vorhin schon erwähnte Abgabe von Alkali aus dem Blut der eine Faktor gewesen sein, der zu vorzeitigem Zerfall der Thrombocyten und damit zu einem beschleunigten Gerinnungsbeginn führte.

Das zweite gerinnungsbeschleunigende Moment dürfte in der Temperatur, bei der die Untersuchungen vor sich gingen, liegen. Das Reagensglas, in dem die Gerinnung beobachtet wurde, befand sich während der Untersuchungen in einem Wasserbade, das eine durchschnittliche Temperaturkonstanz von 22—23° aufwies. Wenn auch der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Gerinnungsfermente bis heute noch nicht sicher erwiesen ist, so lassen doch einige Untersuchungen (*Mellanby* u. a., zitiert nach *Wöhlisch* [12]) mindestens daran denken, daß eine gewisse Veränderung gegenüber der Körpertemperatur vielleicht eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung haben könnte.

Als drittes kommt die gewählte, relativ hohe Calciumkonzentration in Betracht *.

Mit dem angeführten soll nur gezeigt werden, daß die hier registrierten Gerinnungszeiten nicht den Anspruch erheben, als die physiologischen Daten angesehen zu werden. Führend war der Gedanke, eine Methode zu finden, die exakte Vergleichswerte zu schaffen gestattet.

* Letztens ist zu berücksichtigen, daß der Gerinnungsbeginn durch die beschriebene Methode an sich früher gefaßt werden kann, als es bisher möglich war.

Auf die Frage des Latenzstadiums, das auch bei Fibrinogen-Thrombinkurven deutlich hervortritt, wird in der 3. und 4. Mitteilung eingegangen.

Von der Überlegung ausgehend, daß mit der beschriebenen Methode ein Weg gefunden ist, dem Gerinnungsvorgang des Blutes näher zu kommen, wurde nun versucht, die nephelometrische Gerinnungsbestimmung für einige weitere Untersuchungen auszuwerten.

Demzufolge wurde zuerst der Calciumgehalt des Plasmas und sein Einfluß auf die Gerinnungsfähigkeit geprüft. Abb. 4 zeigt 3 Gerinnungskurven von Schweineplasma, bei denen der Calciumzusatz variiert wurde. Die am langsamsten verlaufende Kurve ist die eines Plasmas, dem 0,05 ccm $CaCl_2$ zugesetzt wurden. In Versuch 6 waren 0,1 ccm $CaCl_2$, in Versuch 7 0,15 ccm $CaCl_2$ hinzugefügt worden. Der Kurvenverlauf zeigt deutlich, daß steigender Calciumgehalt eine Beschleunigung des Gerinnungsvorganges bedingt. Mit der Ausführung dieser Versuche und dem gezeitigten Ergebnis soll gezeigt werden, daß die nephelometrische Bestimmungsmethode geeignet erscheint, derartigen Problemen nachzugehen.

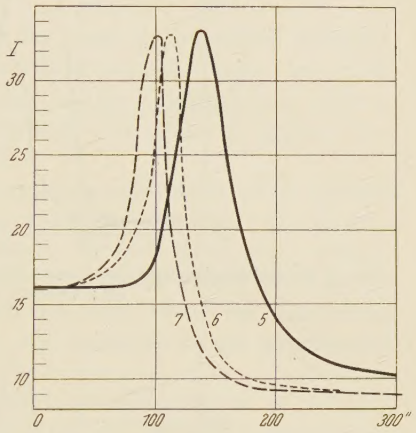

Abb. 4. Tyndallometrische Gerinnungskurven von Schweineplasma unter verschiedenem Calciumzusatz. —— 6,0 ccm Plasma + 0,05 ccm einer 4,25%igen $CaCl_2$-Lösung, ... 6,0 ccm Plasma + 0,10 ccm einer 4,25%igen $CaCl_2$-Lösung, - - - - 6,0 ccm Plasma + 0,15 ccm einer 4,25%igen $CaCl_2$-Lösung.

In Abb. 5 sind zwei Gerinnungsabläufe von Hämophilenplasma desselben Patienten dargestellt. Der Kurvenverlauf weicht deutlich von dem eines Normalplasmas ab. Wie zu erwarten war, steigt die Kurve viel später an. Vielleicht ist hier ein Weg gegeben, dem im Grunde bis heute noch ungeklärten Problem der Hämophilie näherzukommen. Gleichzeitig bestätigen die hier wiedergegebenen Kurven die von *Opitz* und *Zweig*[9] mitgeteilte Wahrnehmung, daß längere Zeit nach der Entnahme aufbewahrtes Hämophilenplasma schneller gerinnt als das kurz nach der Entnahme untersuchte Blut des Hämophilen. In Versuch 14a ist das Plasma 24 Stunden, in Versuch 16 36 Stunden nach der Entnahme auf seinen Gerinnungsverlauf untersucht worden. Auch diese exakte Registrierfähigkeit scheint für die Vorteile der beschriebenen Methode zu sprechen. Nicht entschieden soll werden, ob die Resultate zugunsten der zellulären *(Howell, Opitz-Zweig*[9]*)* oder der plasmatischen Theorie *(Feissly*[16]*, Frank-Hartmann*[17]*)* über die Hämophilie auszuwerten sind.

Zum Schluß sei noch in Abb. 6 (Versuch 24) eine Gerinnungskurve von dem Plasma eines 13jährigen Mädchens mit Hochdrucknephritis wiedergegeben.

Eine Gerinnungsverzögerung oder mindestens eine Blutungsneigung ist schon von mehreren Autoren bei der Nephritis beschrieben worden.

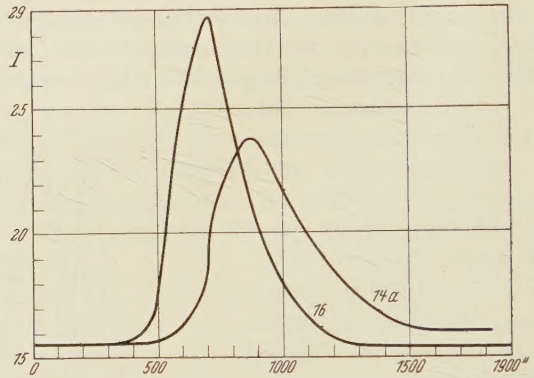

Abb. 5. Tyndallometrische Gerinnungskurven von Hämophilieplasma (Versuch 14a: 24 Std. alt; Versuch 16: 36 Std. alt).

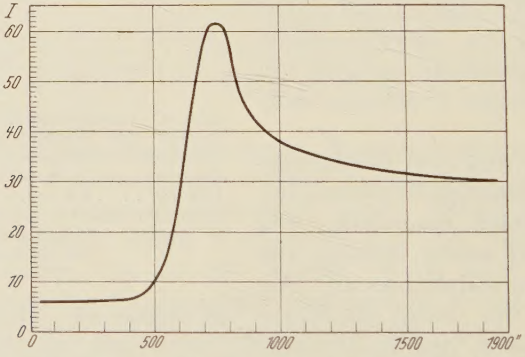

Abb. 6. Tyndallometrische Kurve von Nephritikerplasma (Versuch 24).

Abb. 6 macht in der Tat den verlangsamten Gerinnungsablauf bei Nephritis deutlich. Der Kurvenverlauf unterscheidet sich ganz merklich von dem einer Normalkurve. Hier bezieht sich der Unterschied hauptsächlich auf den verspäteten Gerinnungsbeginn. Der Anstieg der Kurve geht wohl gleichfalls etwas langsamer vor sich als bei Normalplasma. Aber auch gegenüber der Hämophilie zeigt die Nephritis offensichtliche und erhebliche Verlaufsdifferenzen in der Gerinnung, die bei Betrachtung und Vergleichen der Kurven ohne weiteres deutlich werden. Auch diese beschriebenen Unterschiede in dem Kurvenverlauf bei verschiedenen

Krankheiten scheinen für die Verwertbarkeit der beschriebenen Methode zu sprechen. Gerade der Umstand, daß man die den Kurvenverlauf bedingenden Momente kennt und sie für jeden Zeitpunkt registrieren kann, gestattet die Hoffnung, daß durch die nephelometrische Bestimmungsmethode des Gerinnungsablaufs eine Möglichkeit gegeben ist, dem gesamten Problem der Blutgerinnung auf exaktem Wege näherzukommen.

Zusammenfassung.

Es wird eine exakte Methode angegeben, die es gestattet, den Ablauf der Blutgerinnung genau zu verfolgen und graphisch darzustellen. Die Methode basiert auf der Veränderung des tyndallometrischen Effektes, den die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin bedingt. Beginn und Ende der Gerinnung, lediglich soweit sie sich in der Fibrinbildung äußern, werden auf diese Weise eindeutig festgelegt. Die Methode ergibt einen exakt reproduzierbaren Kurvenverlauf.

Eine solche Untersuchungsmethode dürfte es gestatten, einen tieferen Einblick in den gesamten Gerinnungsprozeß zu erhalten. Die genaue Arbeitsweise der beschriebenen Methode fordert dazu auf, weitere Studien über die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin zu machen. Fernerhin kann versucht werden, auch die erste Phase der Gerinnung mit Hilfe der exakten Bestimmung der zweiten Phase eingehender zu untersuchen.

In der neuesten Konstruktion des Stufenphotometers ist es möglich, die hier beschriebenen Untersuchungen an 0,3 ccm Plasma vorzunehmen. Das ist, besonders für die Untersuchungen an Menschenplasma, ein weiterer Gewinn.

Literaturverzeichnis.

[1] *Freundlich:* Capillarchemie. — [2] *Fonio, A.:* Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 6, S. 1. 1928. — [3] *Gärtner, St.:* Kolloid-Z. **48**, 10 (1929). — [4] *Heilmeyer, L.:* Z. exper. Med. **58**, 3/5 (1928). — [5] *Klinke, K.:* Z. exper. Med., im Druck. — [6] *Kottmann:* Z. klin. Med. **69**, 415 (1910). — [7] *Kugelmaß, J. N.:* Arch. internat. Physiol. **21**, 139 (1923). — [8] *Morawitz, P.* u. *Jürgens:* Münch. med. Wschr. **47**, 2001 (1930). — [9] *Opitz, H.* u. *Zweig:* Jber. Kinderheilk. **107**, 155 (1925). — [10] *Pulfrich, C.:* Z. Instrumentenkde **1**, 35—44 (1925). — [11] *Stübel, H.:* Pflügers Arch. **156**, 361 (1914). — [12] *Wöhlisch, E.:* Erg. Physiol. **28**, 1 (1929). — [13] *Wöhlisch, E.:* Z. exper. Med. **27**, 61 (1922). — [14] *Wöhlisch, E.* u. *Pieritz:* Z. exper. Med. **27**, 82 (1922). — [15] *Zangemeister, W.* u. *Krieger:* Münch. med. Wschr. **37**, 1575 (1928). — [16] *Feissly:* Klin. Wschr. **4**, 879 (1925). — [17] *Frank-Hartmann:* Klin. Wschr. **6**, 435 (1927). — [18] *Howell:* The problem of coagulation. Chikago 1925.

Lebenslauf.

Als Sohn des Kaufmanns *Victor Elias* und seiner Ehefrau *Helene*, geb. *Metz*, bin ich am 4. April 1906 in Lipine, Kreis Beuthen O./S., geboren. Nach 3jähriger Vorschulbildung bezog ich das Staatliche Hindenburg-Gymnasium in Beuthen O./S. Infolge Abtretung meiner Heimat an Polen und Übersiedlung meiner Eltern nach Hindenburg O./S. wechselte ich als Obersekundaner an das Staatliche Königin-Luise-Gymnasium in Hindenburg über. Dort erhielt ich am 31. März 1925 das Reifezeugnis. Nach 4semestrigem vorklinischem Studium an der Breslauer Universität bestand ich im März 1927 die ärztliche Vorprüfung. Die 6 klinischen Semester verbrachte ich, mit Ausnahme des Wintersemesters 1928/29, wo ich ordentlicher Hörer der Medizinischen Fakultät in Berlin war, in Breslau. Hier bestand ich im Mai 1930 das Staatsexamen. Seit dem 15. Juni 1930 bin ich Medizinalpraktikant an der Universitäts-Kinderklinik zu Breslau.